

Aus der Frauenklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med. K. G. Ober

Die Tiefkühlkonservierung menschlichen Spermas

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Udo Michael Boquoi

aus

Wuppertal

D 29

1972

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. phil. nat. H. Pauly
Referent: Prof. Dr. med. K.-G. Ober

Tag der mündlichen Prüfung: 4. 12. 1972

Untersuchungen zur Tiefkühlkonservierung des menschlichen Spermas*

K. Bregulla und U. M. Boquoi**

Universitäts-Frauenklinik Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. med. K. G. Ober)

Eingegangen am 12. Februar 1972

Studies on Storage of Human Sperm by Deep Freezing

Summary. For the storage of human semen two methods are described. Technically they are easy. The required equipment is simple compared to the procedure of Behrman and Sawada. Initially the ejaculate is worked up at room temperature. Thereafter it is diluted with a freezing medium and filled into plastic straws (paillettes). Then these portions are cooled by exposing them to a temperature of $+2^{\circ}\text{C}$ for 20 minutes. Thereafter they are placed into a phase of nitrogen vapor of -80°C for freezing. In regard to the motility the results are found to be good. For a homogenous basic material 20 ejaculates were available.

Zusammenfassung. Für die Konservierung menschlichen Spermas werden zwei Verfahren beschrieben. Sie sind technisch einfach. Der apparative Aufwand ist verglichen mit der Arbeitsweise von Behrman und Sawada gering. Das Ejaculat wird zunächst bei Raumtemperatur aufgearbeitet. Dann kommt es nach der Verdünnung mit einem Einfriermedium in Kunststoffröhrchen (Pailletten). Die abgefüllten Portionen werden zuerst für 20 min zur Abkühlung in eine Temperatur von $+2^{\circ}\text{C}$, danach zum Einfrieren für 5 min in eine Stickstoffdampfphase von -80°C gebracht. Auf die Motilität bezogen sind die Ergebnisse gut. Für ein homogenes Ausgangsmaterial standen 20 Ejaculate zur Verfügung.

Die Tiefkühlkonservierung menschlichen Spermas in flüssigem Stickstoff hat die Indikation und die Technik der homologen und heterologen Insemination geändert. Der Wert dieses Verfahrens ist unbestritten [1, 2, 7—10].

Das Sperma wird heute am häufigsten nach dem Verfahren von Behrman und Sawada [2] eingefroren. Der Einfriervorgang ist sehr differenziert. Ein erheblicher apparativer Aufwand (Abb. 1) ist für dieses temperatur- und zeitabhängig gesteuerte Einfrieren notwendig.

Diese Technik wird in der Human- und Veterinärmedizin in gleicher Weise genutzt. In der Veterinärmedizin hat sich aber in den letzten 15 Jahren die Spermienkonservierung ganz entscheidend gewandelt. Zwei Merkmale charakterisieren diese Entwicklung:

* Auszugsweise vorgetragen auf dem VII. Internationalen Weltkongreß für Fertilität und Sterilität in Tokyo und Kyoto 1971.

** D29

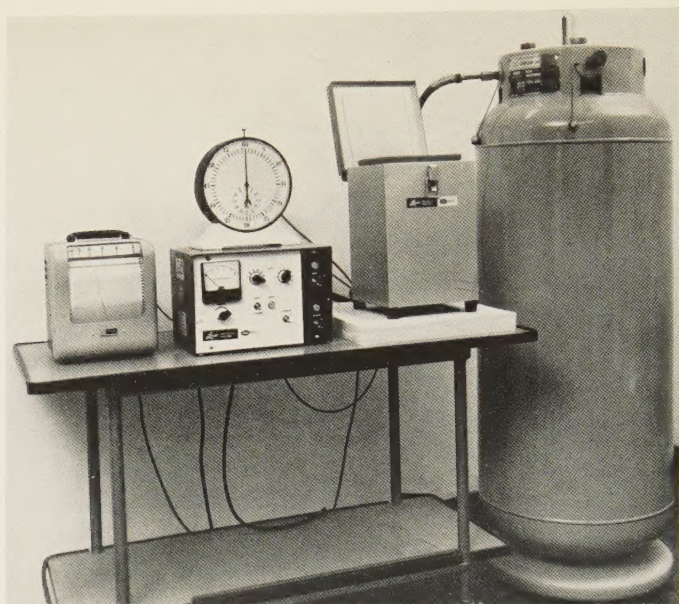


Abb. 1. Halbautomatisch gesteuerte Einfrieranlage (Typ BF-2, Union Carbide Corporation, New York). Von links nach rechts: Temperaturschreiber, Steuergerät, Einfrierkammer und Stickstoffbehälter

1. Die komplizierten Einfrierzeiten und Einfriergeschwindigkeiten wurden vereinfacht.

2. Nach der Erfindung der Pailletten¹, es sind Kunststoffröhrchen, in die das präparierte Sperma abgefüllt wird, ist die Verarbeitung im Vergleich zur Ampullenmethode wesentlich leichter und einfacher geworden.

Die gefüllten Pailletten werden in temperaturkonstante Stickstoffdampfphasen gebracht, dort abgekühlt und danach sofort zur Lagerung in den flüssigen Stickstoff getaucht. Cassou war Schrittmacher dieser Entwicklung [3—5].

Matheson, Carlborg und Gemzell haben 1968 [6] Humansperma in Pailletten eingefroren. Ihre Arbeitsweise war dem von Cassou beschriebenen Vorgehen sehr ähnlich. Die Techniken von Cassou und von Matheson, Carlborg und Gemzell haben uns zu folgenden Überlegungen und Untersuchungen angeregt.

Bis jetzt konnten von einem Ejaculat immer nur zum Einfrieren wenige Portionen hergestellt und anschließend ausgewertet werden.

¹ Instruments de Medecine Veterinaire, Rue Clémenceau, 61-L'Aigle, France.



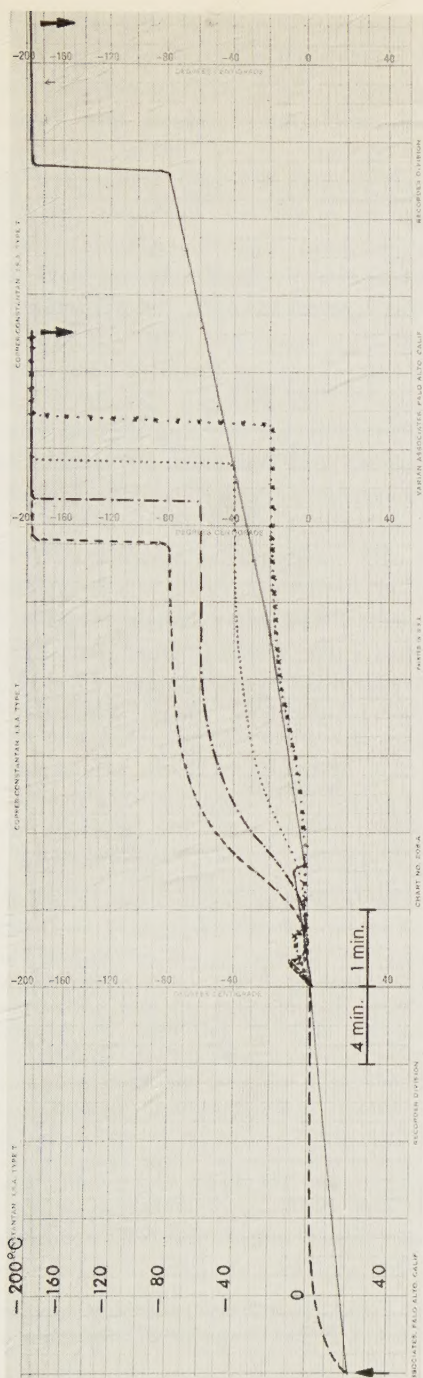


Abb. 2. Auf dem Registrierpapier sind die geschriebenen Temperaturkurven übereinander projiziert. Der Verlauf von $+22$ bis 0°C ist gerafft. Die durchgezogene Linie entspricht den Temperaturen bei dem Verfahren nach Behrman und Sawada. Die gepunkteten und gestrichelten Linien markieren den Temperaturverlauf beim Abkühlen in den temperaturkonstanten Zonen auf $+2^{\circ}$ und beim Eintauchen in die Stickstoffdampfphasen von -20°C , -40°C , -60°C und -80°C . Der steile Abfall aller Kurven am Ende ist durch das Umsetzen in den flüssigen Stickstoff (-196°C) bedingt. Das ist zur Demonstration verzögert gezeichnet

Damit war letztlich eine umfassende Aussage über das Verhalten eines einzigen Ejaculates unter verschiedenen Einfrierbedingungen nicht möglich. Eine exakte Analyse würde die Aufteilung eines Ejaculates in so viele Portionen verlangen, daß zum Einfrieren alle Variationen der Temperatur zwischen $+37^{\circ}\text{C}$ und -196°C und der Zeit zwischen 0 bis ∞ möglich wären. Das ist nicht praktikabel, theoretisch aber zu fordern, wenn man weiß, daß das qualitative Verhalten des Samens eines Spenders nicht konstant ist und sich die Ejaculate verschiedener Spender grundsätzlich unterscheiden. Die Forderung nach einem homogenen Ausgangsmaterial für Untersuchungen zur Spermakonservierung läßt sich aber bedingt erfüllen, wenn mit einer „Mikropaillette“ gearbeitet wird. Da für die Beurteilung der Motilität nach dem Einfrieren Portionen mit weniger als 0,1 ml genügen, lassen sich aus einem Ejaculat von etwa 3 ml bei einer Verdünnung des Spermas mit dem Einfriermedium im Verhältnis 1:1 60 Pailletten mit einem Volumen von 0,1 ml füllen. Man kann solche kleinen Pailletten durch eine entsprechende Kürzung der paillettes fines, die 0,25 ml fassen, herstellen.

In Vorversuchen ließ sich menschliches Sperma in Pailletten mit einem Volumen von 0,25 ml besser einfrieren als in größerkalibrigen Kunststoffröhrchen von gleicher Länge mit einem Volumen von 0,5 ml. Dagegen war ein Unterschied der Motilität nach dem Einfrieren von 0,25 ml und 0,1 ml des verdünnten Spermas nicht zu erkennen. Diese Pailletten unterschieden sich bei gleichem Innendurchmesser lediglich in ihrer Länge.

Methodik

20 Ejaculate, deren Volumen zwischen 2 und 7 ml betrug — Spender waren Studenten im Alter von 20—26 Jahren mit einer Karenzzeit von 3—4 Tagen — wurden aufgearbeitet. Die Motilität schwankte zwischen 51 und 90%, die Spermienzahl zwischen 12 und 135 Mill./ml. Der Samen wurde unmittelbar nach der Verflüssigung bei Raumtemperatur ($+22^{\circ}\text{C}$) mit einem Einfriermedium, wie es Behrman und Sawada beschrieben haben, im Verhältnis 1:1 unter leichtem Schütteln² verdünnt. Das Medium tropfte mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min über eine Rollerpumpe³ zu. Nach dem Mischen mit dem Einfriermedium wurde das Sperma in die Mikropailletten abgefüllt, mit einem Polyvinylalkoholpuder, der im Wasserbad polymerisierte, verschlossen und die Kunststoffröhrchen bei Raumtemperatur für 10—15 min zur Adaption des Spermas gelagert. Danach erfolgte die Aufteilung der Pailletten in 5 Gruppen zu je 10 Stück. Die Identifizierung der einzelnen Paillettengruppen war durch verschiedenfarbige Pailletten und Verschlüßpuder gesichert. Die erste Gruppe wurde nach dem Verfahren von Behrman und Sawada eingefroren. Die Abkühlung von Raumtemperatur bis auf $+2^{\circ}\text{C}$ betrug $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, von $+2^{\circ}\text{C}$ auf -20°C $5-7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ und von -20°C bis -80°C $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Danach wurden die abgekühlten Pailletten in flüssigen Stickstoff eingelagert.

2 Schüttelgerät Typ RCH der Firma Janke & Kunkel KG, Staufen i. Br.

3 Holter Rollerpumpe Typ RL 175, Holter Company, Pennsylvania.

Die Pailletten der Gruppen 2—5 kamen in einen Kühlschrank bei $+2^{\circ}\text{C}$ und wurden nach 20 min in eine temperaturkonstante Stickstoffdampfphase umgesetzt. Die Temperatur betrug bei der Gruppe 2 -20°C , bei der Gruppe 3 -40°C , und bei der Gruppe 4 -60°C und bei der Gruppe 5 -80°C . Alle Pailletten blieben in diesem Temperaturbereich 5 min und wurden dann unmittelbar in flüssigen Stickstoff umgesetzt. Die geschriebenen Temperaturkurven sind in Abb. 2 übereinander projiziert. Als Temperaturfühler lagen selbstgebaute Kupfer-Konstantandrahtelemente in Kontrollpailletten. Sie waren mit einem Varian-Temperaturschreiber⁴ verbunden.

Von jedem Ejaculat war vor dem Einfrieren das Volumen, die Spermienzahl pro ml und die Motilität (AM = Ausgangsmotilität) bekannt. Nach dem Auftauen des eingefrorenen Spermas in einem Inkubator⁵ bei 37°C wurde erneut die Motilität (EM = Endmotilität) geprüft.

Ergebnisse

Die für die einzelnen Ejaculate ermittelten Motilitätswerte sind in Abhängigkeit von dem Einfrierverfahren in Abb. 3 graphisch dargestellt, die einzelnen Werte enthält Tabelle 1. Im Kollektiv ist danach der Motilitätsverlust durch das Einfrieren nach der Technik von Behrman und Sawada am geringsten, dann folgt die Gefrierung in den Stickstoffdampfphasen bei -80°C und -60°C , die Verteilung war hier gleich, dann bei -20°C und zuletzt bei -40°C . Im Einzelfall liegen die günstigsten Resultate anders.

Die in Tabelle 1 eingetragenen Daten wurden mit Hilfe eines Computers einer Varianzanalyse unterworfen. Eine einfache Abhängigkeit zwischen dem gewählten Einfrierverfahren und der Motilität (AM und EM) des Samens war nicht zu erkennen, d.h. jedes Ejaculat hat eine optimale Einfrierungstemperatur. Diese läßt sich aber bei dem angewandten Verfahren nur durch eine Untersuchung, die meist das ganze Ejaculat verbraucht, herausfinden. Interpretiert man dieses Ergebnis für die Praxis, so wäre außer dem bisher benutzten apparativ gesteuerten Einfrierverfahren das menschliche Sperma auch mit gutem Erfolg technisch einfacher und finanziell weniger aufwendig zu konservieren.

Wir benutzen dazu folgende Techniken. Das Sperma wird nach der Verflüssigung bei Raumtemperatur mit dem Einfriermedium tropfenweise unter leichtem Schütteln im Verhältnis 1:1 gemischt. Das Einfriermedium kann tropfenweise über eine Pipette zufließen. Nach dem Aufziehen des verdünnten Spermas in die Pailletten erfolgt die Adaption für 10—15 min bei Raumtemperatur. Die verschlossenen Pailletten werden dann in einen Eisschrank bei $+2^{\circ}\text{C}$ für 20 min gelegt und daran anschließend zum Einfrieren in eine Stickstoffdampfphase von -80°C liegend (Horizontalverfahren) oder stehend (Vertikalverfahren) gebracht. Die Ergebnisse beider Verfahren sind bei gleichen Temperaturen für die

⁴ Varian associates, Paolo Alto, California.

⁵ W. C. Heraeus GmbH (Hanau).

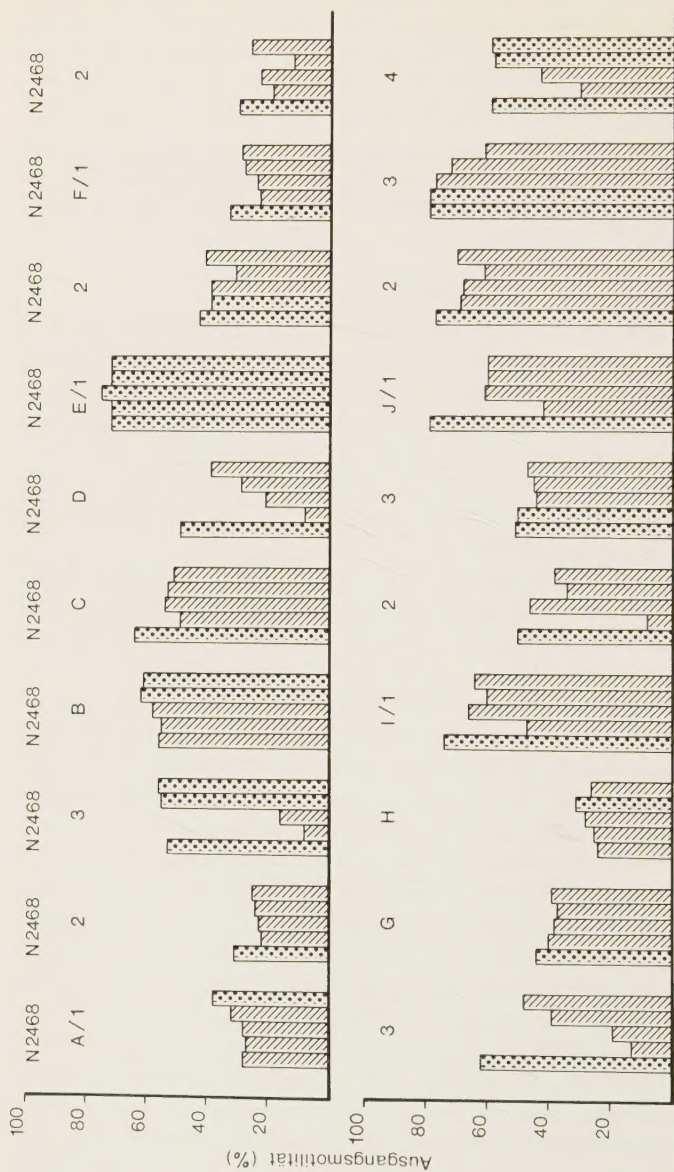


Abb. 3. Das Säulendiagramm zeigt die Abhängigkeit der Motilität von den verschiedenen Einfrierverfahren. Jede Säulengruppe verkörpert ein Ejaculat, die einzelnen Spender sind durch Buchstaben gekennzeichnet, mehrere Ejaculate des gleichen Spenders sind fortlaufend nummeriert. Die ablesbaren Werte der verschiedenen Einfrierstechniken (N = Verfahren nach Behrman und Sawada, 2 = Einfrieren bei -20°C , 4 = bei -40°C , 6 = bei -60°C und 8 = bei -80°C) entsprechen direkt den Prozentzahlen, wobei die Ausgangsmotilität 100% betrug. Die Säulen mit den besten Motilitätswerten sind ausgepunktet. Sind bei einem Ejaculat mehrere Säulen punktiert, so handelt es sich um nicht voneinander signifikante Motilitätsdaten.

Tabelle 1. Ergebnisse der Spermatiefkühlkonservierung umgerechnet auf Prozent der Ausgangsmotilität

	AM	N	—20° C	—40° C	—60° C	—80° C
A 1	63	28,1	26,8	27,8	31,7	37,5
2	63	30,5	21,6	23,3	23,5	24,8
3	61	53,4	7,7	16,4	55,1	56,1
B	71	56,3	55,4	58,0	61,7	60,8
C	73	64,1	48,8	54,5	53,2	51,2
D	66	48,9	7,7	20,6	29,1	39,8
E 1	71	42,7	39,0	38,7	31,0	40,8
2	78	71,8	72,3	74,5	72,3	71,7
F 1	73	33,3	22,9	24,0	28,1	29,2
2	88	29,7	19,4	23,2	12,0	25,7
3	74	61,5	12,6	19,3	39,2	48,2
G	80	43,6	39,9	37,8	36,6	38,9
H	51	23,7	25,1	28,0	31,0	26,1
I 1	66	73,6	47,4	66,7	59,8	63,8
2	83	49,9	7,7	46,3	34,1	38,4
3	78	50,9	49,6	44,1	45,4	46,5
J 1	89	78,9	42,4	60,7	59,9	59,6
2	90	77,3	69,0	68,2	61,3	70,3
3	84	78,7	78,6	77,1	71,5	61,3
4	88	58,5	30,2	43,0	58,4	59,4

N = Verfahren nach Behrman und Sawada.

Die angegebenen Temperaturen von —20° C bis —80° C entsprechen dem Einfrierverfahren in temperaturkonstanten Stickstoffphasen.

AM = Ausgangsmotilität.

Die einzelnen Spender sind durch Buchstaben gekennzeichnet, mehrere Ejaculate eines Spenders fortlaufend numeriert.

Pailletten mit einem Volumen von 0,5 ml nicht unterschiedlich. Für das vertikale Einfrieren sind 2 Stickstofflagerbehälter⁶ nötig. In einem muß durch das Einfüllen flüssigen Stickstoffs eine Dampfphase mit einer Temperatur von —80° C erzeugt werden. Das ist nur in einem entsprechend hohen Thermosgefäß mit einem sehr niedrigen Flüssigstickstoffspiegel möglich. Die Höhe der Stickstoffdampfphase von —80° C sollte zumindest der Länge der Paillette mit 13 cm entsprechen. Zum Ausmessen und Einstellen der geforderten Temperatur im Stickstoffdampf eignet sich eine Paillette, die an beiden Enden und in der Mitte mit

⁶ CRYO Diffusion, Lery, France.

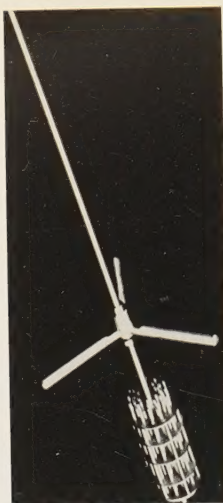


Abb. 4

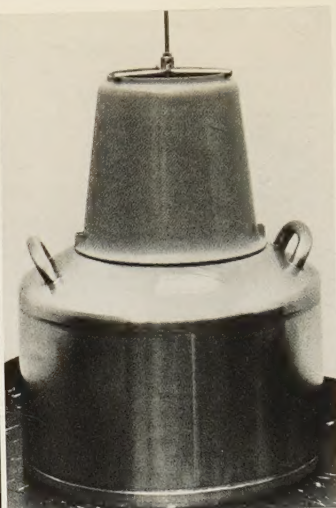


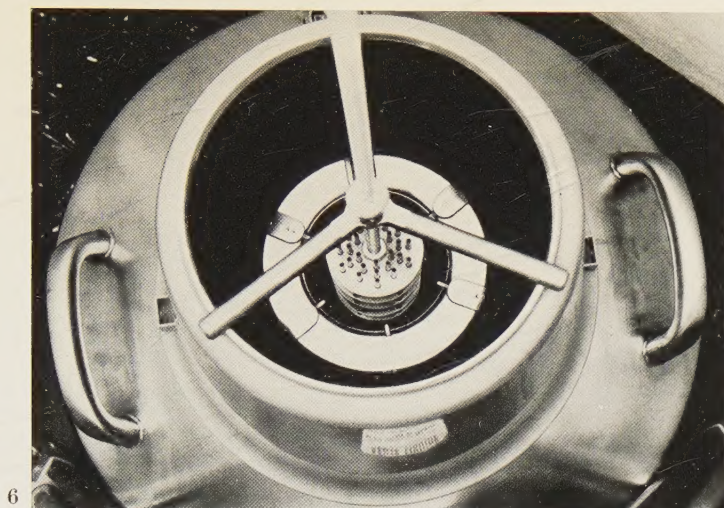
Abb. 5

Abb. 4—6. Bei dem Vertikalverfahren stehen die gefüllten Pailletten in einem Korb. Er wird in einen mit nur wenig flüssigem Stickstoff beschickten Container getaucht. Die Höhe des gewünschten Temperaturbereiches (-80°C) in der Dampfphase wurde vor dem Eintauchen mit Thermoelementen ermittelt. Der kegelstumpfähnliche Aufsatz auf dem Stickstoffbehälter verbessert die Temperaturkonstanz der Stickstoffdampfzonen

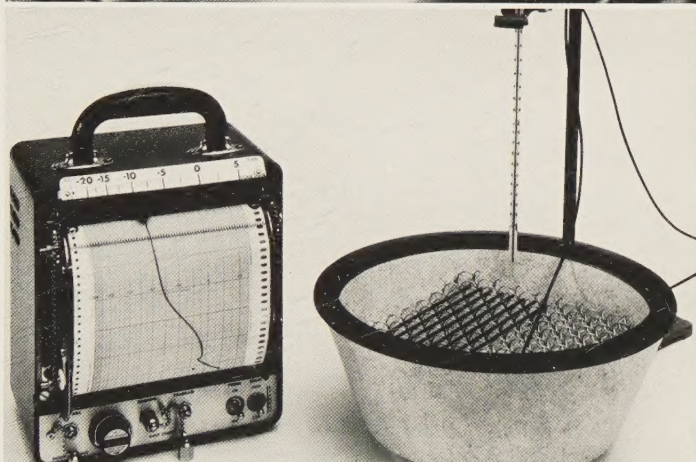
Thermoelementen bestückt ist, am besten. Ein einfaches Thermometer ist hier unzureichend.

Für das Eintauchen in den negativen Temperaturbereich benutzen wir den in Abb. 4—6 dargestellten Korb. In ihm sind die Pailletten so gelagert, daß sie einzeln stehen und damit für alle eine gleiche Abkühlrate erreicht wird. Der Korb ist an einem Stab befestigt und dadurch in verschiedenen Höhen arretierbar. Abhängig von der Zahl der Bohrungen im Korb können verschieden viele Ejaculate untergebracht werden (Abb. 4—6). 5 min nach dem Eintauchen sind die Pailletten auf -80°C abgekühlt. Sie werden dann direkt in den zweiten voll mit flüssigem Stickstoff gefüllten Lagerbehälter umgesetzt und sind dort bei einer Temperatur von -196°C bis zum Gebrauch monatelang haltbar.

Bei dem Horizontalverfahren kommen die im Kühlschrank auf $+2^{\circ}\text{C}$ abgekühlten Pailletten auf einem Gitter liegend in die Stickstoffdampfphase von -80°C . Der Bereich gleicher Temperatur braucht bei dieser Arbeitsweise nur sehr schmal zu sein, etwa 1 cm, er ist damit sehr viel leichter herstellbar und läßt sich auch ohne Thermoelemente mit einem einfachen Thermometer ermitteln. Als Thermosgefäße sind weitlumige



6



7

Abb. 7. Zum Einfrieren nach dem Horizontalverfahren liegen die Pailletten auf dem Gitter im Stickstoffdampf bei -80°C . Die Temperatur läßt sich mit einem einfachen Thermometer messen. Zusätzlich registriert ein Thermoelement in einer Paillette die Abkühlung und überträgt sie dem Temperaturschreiber

Behälter notwendig. Am billigsten, technisch aber ausreichend zum Einfrieren weniger Ejaculate, sind Styroporschalen (Abb. 7). Auch beim Horizontalverfahren sind die Pailletten nach 5 min auf -80°C abgekühlt und können dann in einen vollgefüllten Stickstoffcontainer eingebracht werden.

Literatur

1. Behrman, S. J., Ackerman, D. R.: Freeze preservation of human sperm. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **103**, 654 (1969).
2. Behrman, S. J., Sawada, Y.: Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator. *Fertil. and Steril.* **17**, 457 (1966).
3. Cassou, R.: Nouvelle technique d'insemination artificielle. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **144**, 486 (1950).
4. Cassou, R.: Methode Francaise d'Insemination. Broschüre der Besamungsstation L'Aigle/Orne, 1959.
5. Cassou, R.: La miniaturisation des paillettes. VI. Congr. de Repr. et Ins. Art. Paris, Juillet 1968.
6. Matheson, G. W., Carlborg, L., Gemzell, C.: Frozen human semen for artificial insemination. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **104**, 495 (1969).
7. Perloff, W. H., Steinberger, E., Sherman, J. K.: Conception with human spermatozoa frozen by nitrogen vapor technic. *Fertil. and Steril.* **15**, 501 (1964).
8. Sawada, Y.: The preservation of human semen by deep freezing. *Int. J. Fertil.* **9**, 525 (1964).
9. Sherman, J. K.: Improved methods of preservation of human spermatozoa by freezing and freeze-drying. *Fertil. and Steril.* **14**, 49 (1963).
10. Sherman, J. K., Bunge, R. C.: Observation on preservation of human spermatozoa at low temperatures. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **82**, 686 (1953).

Dr. K. Bregulla
Universitäts-Frauenklinik
Erlangen-Nürnberg
D-8520 Erlangen
Universitätsstraße 21/23
Bundesrepublik Deutschland

Lebenslauf

Am 26.4.1946 wurde ich als Sohn des Großhandelskaufmanns Josef Boquoi und seiner Ehefrau Hilde, geb. Alex, in Wuppertal geboren. Von Ostern 1952 bis 1956 besuchte ich die Grundschule, anschließend bis 1959 eine Realschule. Im Sommer 1959 wurde ich auf das Staatliche Gymnasium in Wuppertal umgeschult, wo mir im März 1966 das Reifezeugnis zuerkannt wurde.

Nach Bestehen einer Eignungsprüfung wurde ich zum Sommersemester 1966 in Bonn für das Studienfach Zahnmedizin zugelassen. Am 28.4.1967 bestand ich den naturwissenschaftlichen Teil der zahnärztlichen Vorprüfung.

Am 30.9.1967 wurde eine Zweiteinschreibung für das Studienfach Medizin genehmigt, und ich bestand am 19.3.1968 die naturwissenschaftliche Vorprüfung. Am 21.7.1969 legte ich die ärztliche Vorprüfung, am 16.10.1969 die zahnärztliche Vorprüfung ab.

Seit dem Sommersemester 1970 studierte ich Medizin in Erlangen. Das Staatsexamen beendete ich am 30. November 1972 mit der Note sehr gut.

Udo Michael Boquoi

